

氏 名 西本 れい

学位(専攻分野) 博士(医学)

学位記番号 総研大甲第 1849 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of TRP channel functions in sensory neurons and
microglia

論文審査委員 主 査 教授 古瀬 幹夫
教授 富永 真琴
教授 池中 一裕
教授 小泉 修一 山梨大学大学院

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Transient receptor potential (TRP) channels are non-selective cation channels involved in a wide variety of sensing functions in our body, including pain and temperature sensation. The TRP channel superfamily is conserved in yeast, invertebrates and vertebrates and composed of 28 members which are divided into 6 subfamilies in mammals, based on their protein sequence homology: canonical or classic (C), vanilloid (V), melastatin (M), polycystin or polycystic kidney disease (P), mucolipin (ML), ankyrin (A). The mechanisms activating TRP channels are highly diversified: activation by temperature, by chemical molecules or activation downstream of signal transduction pathways. Additionally, it is well known that TRP channels are polymodal receptors. The TRP channel activators cause synergistic effects on TRP channel activity when different types of activators exist at the same time. Thus, TRP channels attract us to study about their physiological and pathological significance involved in our lives. In this doctoral thesis study, I focused on TRP channel functions involved in the mechanism of pain sensation induced by propofol, a general anesthetic drug (Chapter I) and the mechanism of temperature-dependent microglia motility (Chapter II).

Propofol, a commonly used intravenous anesthetic agent, is known as a modulator and an activator of GABA_A receptors in the central nervous system. It is also known to sometimes cause pain sensation upon injection in humans. However, the molecular mechanisms underlying this harmful effect are not fully understood. Propofol is so far reported to activate TRPA1 and TRPV1 in rodents, but the propofol effect on the latter is still controversial. Furthermore, it is still unclear whether propofol can activate them in humans. To address whether propofol can activate TRPV1 and TRPA1 in humans and mice, I utilized patch-clamp recordings and Ca²⁺-imaging using the heterologous expression system and mice in Chapter I. In patch-clamp recordings using HEK293T cells, I observed propofol-evoked currents in HEK293T cells expressing human TRPA1, mouse TRPA1 or mouse TRPV1, but not in HEK293T cells expressing human TRPV1. Next, I performed Ca²⁺-imaging to evaluate propofol action on sensory neurons using dorsal root ganglion (DRG) cells prepared from wild-type (Wt), *Trpv1*-knockout, *Trpa1*-knockout or *Trpv1/Trpa1* double knockout (V1A1DKO). I found that propofol caused increases in intracellular Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_i) in DRG cells from Wt, suggesting the ability of propofol to activate Ca²⁺-permeable proteins in DRG cells. Such propofol-induced [Ca²⁺]_i increases were still observed in a considerable portion of DRG cells from V1A1DKO mice, indicating the existence of TRPV1- and TRPA1-independent mechanisms for propofol action. By using Ca²⁺-imaging and patch-clamp recordings, I investigated the involvement of type A γ -amino butyric acid (GABA_A) receptor activation in this phenomenon because it is reported that GABA_A receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in some population of DRG cells could be involved in the mechanism of muscimol-induced [Ca²⁺]_i increases. I found that propofol produced action potential generation in GABA_A receptor-dependent manner and

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

that both T-type and L-type Ca^{2+} voltage-gated Ca^{2+} channels are activated downstream of GABA_A receptor activation by propofol. Thus, propofol may cause pain sensation through multiple mechanisms involving not only TRPV1 and TRPA1 but also voltage-gated channels downstream of GABA_A receptor activation.

In Chapter II, I tried to clarify the involvement of TRP channel functions in the mechanism of temperature-dependent microglia motility. Microglia are resident immune cells in the brain, which take important parts in the maintenance of brain homeostasis. Surveillant microglia can transform into activated phenotype and migrate in response to the environmental changes under pathological conditions. Therapeutic hypothermia is an effective treatment for neural protection in the clinical field and also suppresses microglial functions such as cytokine release. However, there are few studies focusing on the molecular basis involved in the changes of microglial function in therapeutic hypothermia. Therefore, I tried to evaluate the involvement of thermosensitive TRP channels in microglia movement in mice using temperature-controlled time-lapse imaging system, patch-clamp recordings and molecular techniques.

I found that microglia movement is temperature-dependent using temperature-controlled time-lapse imaging. I also found some clues showing the involvement of TRPM4 activation in the temperature-dependent microglia movement. I observed TRPM4 expression in mouse microglia not only at an mRNA level by RT-PCR but also at a protein level by immunocytochemistry. Moreover, heat-evoked currents in microglia were inhibited by 9-phenanthrol, a TRPM4 inhibitor, in a dose-dependent manner. Finally, I observed that the temperature-dependency of microglia movement was diminished by 9-phenanthrol treatment. These data suggest that TRPM4, a thermosensitive monovalent cation-permeable TRP channel, might be involved in the mechanism of temperature-dependent microglia movement.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

出願者は、「Analysis of TRP channel functions in sensory neurons and microglia」という課題のもと、麻酔薬propofolが引き起こす痛覚、およびミクログリア細胞の遊走性の温度依存性という2つの現象についてTRPチャンネルの関与を解明する研究を行った。まず、臨床で広く使われる静脈麻酔薬propofolのイオンチャンネルに対する効果の解析をカルシウムイメージング法とパッチクランプ法を用いて行い、propofolがマウスTRPV1、マウスTRPA1、ヒトTRPA1を活性化することを見いだした。各TRPチャンネルを発現させたHEK293T細胞を用いた解析では、特にヒトTRPA1活性化能が強いことが明らかとなり、propofolによるヒトの静注初期に見られる血管痛は血管壁に分布する感覚神経に発現するTRPA1を活性化することによって引き起こされると考えられた。マウス単離後根神経節細胞(DRG細胞)を用いた解析では、機能的にTRPA1、TRPV1を発現する細胞でpropofolによる細胞内カルシウム上昇が観察されたが、TRPA1、TRPV1ダブル欠損マウスから調製した細胞でもpropofolで細胞内カルシウム濃度上昇が見られたことから、TRPA1、TRPV1以外の分子の関与が推察された。PropofolによるTRPA1、TRPV1二重欠損DRG細胞での細胞内カルシウム上昇がGABA_A阻害剤picrotoxinでほぼ完全に抑制されたことから、GABA_A受容体の関与を推定した。さらに、TRPA1、TRPV1二重欠損DRG細胞において、propofolによる細胞内カルシウム上昇がL型およびT型の電位作動性カルシウムチャンネル阻害剤で強く抑制されたことから、GABA_A受容体活性化によるクロライド流出が脱分極を引き起こし、その脱分極によって電位作動性カルシウムチャンネルが活性化して細胞内へのカルシウム流入がもたらされているものと考えられた。膜電位記録において、propofol投与によって活動電位が発生し、その活動電位発生がpicrotoxinで完全に抑制されることが観察された。このように、出願者は、propofolは複数のメカニズムを介して細胞膜を脱分極させて電位作動性Na⁺チャンネル活性化から痛み感覚を引き起こすことを明らかにした。

出願者は次に、臨床において行われる脳低温療法の分子メカニズムを明らかにするために、ミクログリアに焦点をあてて温度の影響を観察した。マウスミクログリアの純粋培養系を確立した後、タイムラプス法を用いて、33度、37度、40度における細胞移動を観察した。37度でのミクログリアの運動能は33度で低下し40度で増強した。2時間の細胞の動きを定量する解析法を開発して定量解析を行ったところ、ミクログリアの動きに温度依存性があることが明らかとなった。そこで、マウスミクログリアでの温度感受性TRPチャンネル遺伝子の発現を解析し、*Trpv4*、*Trpm2*、*Trpm4*、*Trpv2*の発現を確認したが、体温域で活性化するTRPV4、TRPM2、TRPM4に絞って解析した。TRPV4 欠損ミクログリア、TRPM2欠損ミクログリアでは、37度で野生型ミクログリアと動きに差はなかった。そこで、TRPM4に着目した。細胞内カルシウム1 μMの条件にした野生型ミクログリアでは、温度刺激で活性化する外向き整流性を有する電流が観察され、この電流はTRPM4の特異的阻害剤9-phenanthrolで抑制されたことから、マウス野生型ミクログリアでのTRPM4の機能的発現を確認した。タイムラプス法による温度依存的なマウスミクログリアの運動変化が9-phenanthrolで濃度依存的に抑制されたことから、マウスミクログリアの温度上昇に伴う

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

運動能の増強にTRPM4が関わっているものと結論した。

以上のように、出願者は感覚神経とミクログリアに発現する温度感受性 TRP チャンネルの発現と機能の解析を行い、それらが病態生理機能に深く関わっていることを示した。その科学的価値は高く評価でき、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。したがって、審査委員全員が本論文は学位論文として相応しいものであると判断した。